

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. Dr. W. Neumann

ZUM MECHANISMUS DER MASTZELLZERSTÖRUNG
DURCH BAKTERIELLE UND TIERISCHE GIFTE

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius - Maximilians - Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Hilde Kachler
aus Petschau

Würzburg 1958

STANFORD-LANE MEDICAL LIBRARY



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem. Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. Dr. W. Neumann

ZUM MECHANISMUS DER MASTZELLZERSTÖRUNG
DURCH BAKTERIELLE UND TIERISCHE GIFTE

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius - Maximilians - Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Hilde Kachler
aus Petschau

Würzburg 1958

Referent: Privatdozent Dr. E. Habermann

Korreferent: Professor Dr. Dr. W. Neumann

Tag der Promotion:

16. 12. 58

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

Meinen lieben Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I.. Einleitung	1
II. Eigene Versuche	8
A. Methodik	8
B. Versuche in vitro	11
C. Versuche in vivo	18
III. Besprechung	21
IV. Zusammenfassung	23
Literaturverzeichnis	I

EINLEITUNG

Im Jahre 1877 entdeckte Paul Ehrlich, daß manche Zellen des Tierorganismus bei Färbung mit bestimmten basischen Farbstoffen Metachromasie zeigen. In der Meinung, sie stünden in Beziehung zur Ernährung des Gewebes, nannte Ehrlich diese Zellen "Mastzellen". Diese Erklärung wurde zwar späterhin abgelehnt, der Name jedoch beibehalten.

MORPHOLOGIE DER MASTZELLEN

In den folgenden Jahren befaßte man sich hauptsächlich mit der Histologie dieser Zellen. Das konstante Vorkommen grober, basophiler Granula ist notwendig zur Identifizierung einer Mastzelle (Maximow). Die Form des Zelleibes ist gewöhnlich oval bis spindelig, oft aber unregelmäßig, mit langen Ausläufern, je nach Beschaffenheit des umgebenden Gewebes (Westphal). Größe und Verteilung der Zellen variieren je nach Tierart und dem Alter des Organismus. So sind sie bei der Maus und bei der Ratte besonders reichlich im lockeren Bindegewebe vorhanden, beim Hund in der Leber; sie sind regelmäßig in der Meerschweinchenlunge und in Lunge und Haut der Katze anzutreffen. Hauptsitz ist immer das Bindegewebe, sei es das lockere Bindegewebe, das perivaskuläre Gewebe oder das interstitielle Bindegewebe innerer Organe (Nagayo).

Neben diesen Gewebsmastzellen gibt es noch eine andere Form, die Blutmastzellen oder basophilen Leukozyten. Sie werden im Knochenmark gebildet und treten mit den anderen Leukozyten ins periphere Blut. Auch diese Art ist charakterisiert durch ihre zytoplasmatischen Granula und die große Affinität zu basischen Farbstoffen.

FUNKTION DER MASTZELLEN

Da die Mastzellen im ganzen Tierreich zu finden sind, machte man sich bald Gedanken über ihre funktionelle Bedeutung. Maximow sowie Staemmler nahmen an, daß die Mastzellen ihre Granula in das umgebende Gewebe abstoßen würden und faßten sie als einzellige drüsige Organe auf. Da sie meist im Bindegewebe vorkommen, sollten sie das zur Bildung der interfibrillären Kittsubstanz nötige Mucin produzieren. Auch über die Chemie der Mastzellgranula herrschten verschiedene Meinungen. Ehrlich hielt sie für Eiweiß, Arnold für glykogenähnliche Stoffe, andere hielten sie für Mucin.

MASTZELLEN UND HEPARIN

Im Jahre 1916 entdeckte der Physiologe Howell eine koagulationshemmende Substanz und nannte sie Heparin nach dem Organ, in dem sie erstmals gefunden wurde. Jorpes gelang es 1935, Heparin rein darzustellen; es besteht zu mehr als 90 % aus Chondroitinschwefelsäure und ist mit Toluidinblau metachromatisch anfärbbar. Da die Leber nicht der einzige Ort war, wo Heparin gefunden wurde und die metachromatische Färbbarkeit des Knorpels, des Schleims und der Mastzellen auf dem Gehalt an Chondroitinschwefelsäure beruht, untersuchte man auch diese Gewebsteile auf gerinnungshemmende Wirkung. Auf diese Weise stellten Jorpes und seine Kollegen fest, daß das Heparin des Körpers nur in den Mastzellen zu finden ist. Die anderen metachromatisch färbbaren Gewebsbestandteile zeigten keine Heparinwirkung. Später wiesen Holmgreen und Wilander nach, daß ein Parallelismus zwischen dem Gehalt parenchymatöser Organe an Heparin und an Mastzellen besteht. Besonders hohe Heparinkonzentrationen wurden in Mastzelltumoren des Hundes gefunden. Köksal gelang es an Mastzellzentrifugaten nachzuweisen, daß die Mastzellgranula koagulationshemmende Fähigkeit besitzen.

MASTZELLEN UND HISTAMIN

Später brachten weitere Beobachtungen Riley auf die Vermutung, daß die Mastzellen neben dem Heparin auch noch Histamin enthalten könnten:

Peptoninjektion führt beim Hund neben Ungerinnbarkeit des Blutes auch einen Schockzustand herbei, der auf die Freisetzung von Histamin zurückzuführen war. Da aber weder auf eine Heparininjektion Histamin, noch umgekehrt auf eine Histamininjektion Heparin freigesetzt wird, muß Pepton beide Stoffe gleichzeitig freisetzen. Da nun Heparin aus den Mastzellen stammt, lag der Schluß nahe, daß Histamin ebenfalls in diesen Zellen zu suchen ist. -

Bei der Urticaria pigmentosa, deren histologisches Substrat gutartige Mastozytome, d. h. lokale Anhäufungen von Mastzellen unter der Haut sind, führen geringe Traumen zur lokalen Erscheinung der "triple response", einem klassischen Zeichen für die Histaminfreisetzung in der Haut.

Auf diese Beobachtungen hin begannen Riley und West histologisch die Wirkung von histaminfreisetzenden Substanzen auf die Mastzellen zu untersuchen, und es zeigte sich, daß die Mastzellen durch sie zerstört wurden. Eine Beziehung zwischen Histamin und den Mastzellen besteht auch bei dem extrem hohen Histamingehalt der Mastzelltumoren und beim Vergleich embryonaler Organe, die wenige oder keine Mastzellen enthalten, mit denen Erwachsener. Schließlich sinkt in gleichem Maße wie die Mastzellen auf eine i. v. Injektion von z. B. Compund 48/80 zerstört werden, auch der Histamingehalt der Organe.

Nach Uvnäs besteht allerdings nicht in allen Geweben eine befriedigende quantitative Beziehung zwischen Histamingehalt und der Anzahl der Mastzellen. Im Gastrointestinaltrakt findet man viel Histamin, aber relativ wenig Mastzellen. In der Haut soll das Histamin im Corium vorkommen, einer Zone, die keine Mastzellen enthält. Histamin kann demnach auch außerhalb der Mastzellen als Gewebshistamin im engeren Sinne vorkommen. Da dieses jedoch nur einen geringen Teil des Gesamthistamins ausmacht und nicht durch die untersuchten histaminfreisetzenden Substanzen mobilisiert wird, bleiben die Mastzellen von besonderem Interesse.

Dabei taucht die Frage auf, wo das Histamin in der Zelle zu finden ist. Köksal war es gelungen, die antikoagulante Wirkung und damit das Heparin in den Mastzellgranula nachzuweisen. In der auf gleiche Weise gewonnenen Granulafraktion fand West auch die Hauptmasse des Histamins. Riley und West stellten außerdem fest, daß nur dann der Histamingehalt eines Gewebes sinkt,

wenn die Granula aus den Zellen verschwinden. Degranulierte Mastzellen können im Gewebe, das sein Histamin verloren hat, noch vorhanden sein. Die Regranulierung geht nur langsam vor sich und ist mit der Rückkehr des Histamins verbunden.

Somit dürfte sicher sein, daß beide Substanzen, Heparin und Histamin, normalerweise nebeneinander in den Mastzellgranula vorkommen. Da beide entgegengesetzte Ladungen tragen, nahm man an, sie bildeten zusammen ein Salz, ein "Heparinat des Histamins". Riley hält eine kompliziertere Struktur für wahrscheinlich.

Nach Blaschko befinden sich in der Zellflüssigkeit synthetisierende Enzyme und Amine, unter ihnen Histamin. Letzteres soll dort gebildet und dann in den Granula gelagert werden. Das bedeutet, daß das gebildete Histamin durch die Membran der Granula passieren muß. Ob unter physiologischen Bedingungen Histamin von den Granula in die Zellflüssigkeit und von da durch die Zellmembran ins umgebende Gewebe gelangen kann, ist nicht bekannt.

Da das Histamin von zwei Membranen, der Zellmembran und der Granulamembran, umgeben ist, müßte eine Theorie über die Histaminfreisetzung erklären, wie das Histamin durch beide Membranen gelangt, die normalerweise für freies Histamin undurchgängig sind.

In neuen Untersuchungen haben Burnett, Hagen und Lee festgestellt, daß die Mastzellgranula außer Heparin und Histamin auch 5-Hydroxytryptamin enthalten.

HISTAMINFREISETZUNG

Unter der großen Zahl der histaminfreisetzenden Substanzen, die wir heute kennen, gibt es zwei Gruppen, die synthetischen und die biologischen Ursprungs.

MacIntosh und Paton zeigten in ihrer Aufstellung der chemischen Histaminfreisetzer, daß Histamin aus dem Gewebe durch viele basische Substanzen, Diamine, Diguanidine etc. freigesetzt werden kann, die alle eine ge-

wisse strukturelle Ähnlichkeit mit dem Histamin selbst haben. Sie vermuteten, daß diese organischen Basen die Zell- und Granulamembran durchdringen und sich dann an die Stelle des Histamins setzen. Nach Uvnäs läßt sich diese Theorie vielleicht für einige organische Basen anwenden, jedoch nicht für Stoffe wie Compound 48/80 oder gar destilliertes Wasser, das ja auch histaminfrei-setzende Wirkung haben kann.

Feldberg und Kellaway gehen bei ihrer Theorie von Kobragift aus. Es enthält Phospholipase A, welche im Körper zur Bildung von Lysolecithin führt. Lysolecithin wiederum verursacht Hämolyse und macht, wie Versuche mit gereinigtem Lysolecithin zeigten, die Zellen durchgängig für ihr Histamin. Sie nahmen daher an, Histamin sei an Lipoproteine gebunden, von denen es durch die lytische Fähigkeit des Lysolecithins abgespalten werden könne. Die Theorie Feldbergs wurde bereits aufgestellt, als die Lokalisation des Histamins in den Mastzellen noch nicht bekannt war. Nach Högberg liegt kein experimenteller Beweis dafür vor, daß Histamin an Lipoproteine gebunden ist und von diesen durch Lysolecithin abgespalten wird.

Eine neue Anschauung über den Mechanismus der Histaminfreisetzung, die Högberg und Uvnäs aufstellten, stützt sich auf folgende Grundlagen:

- 1.) Die Freisetzung von Histamin kann durch einen enzymatischen Prozeß erfolgen,
- 2.) Histamin befindet sich in den Granula nur in schwachen Ionenbindungen, die keinen enzymatischen Prozeß fordern, um es freizusetzen.

Daraus entwickelten Högberg und Uvnäs folgende Hypothese: Ein lytisches Enzym befindet sich normalerweise an der Zelloberfläche; dieses ist jedoch inaktiv, da seine aktive Gruppe durch einen hypothetischen Stoff gehemmt wird. Wenn dieser Hemmstoff nun z. B. durch Compound 48/80 oder eine andere histaminfreisetzende Substanz inaktiviert wird, wird das Enzym aktiv und greift die Zellmembran an. Högberg und Uvnäs untersuchten eine Reihe von Enzymen und stellten fest, daß nur Lecithinase A die Fähigkeit der Mastzellzerstörung hat. Sie nahmen daher an, daß es sich bei dem zelleigenen lytischen Enzym ebenfalls um eine Lecithinase A handeln könne. Während der Abfassung dieser Arbeit berichtete jedoch Uvnäs über Mastzellzerstörung durch Gasbrandgift,

das bekanntlich reich an Phospholipase C ist.

Eine andere Theorie stellte Rocha e Silva auf, um die Histaminfreisetzung durch Schlangengifte zu erklären. Er schrieb die Histaminfreisetzung der Aktivierung eines Enzyms zu, welches Histamin von den Polypeptiden trenne. Es liegt aber bisher kein Beweis für eine Bindung von Histamin an Proteine vor. Nicht zur Proteasentheorie passend ist der Befund von Högberg und Uvnäs, daß proteolytische Enzyme in vitro nicht zur Zerstörung von Mastzellen imstande sind.

Im Rahmen unserer Arbeit versuchten wir, eine Reihe von tierischen Giften und daraus gewonnene Substanzen in vitro und in vivo auf ihre mastzellenzerstörende Fähigkeiten zu prüfen und damit einen Anhalt für die Beurteilung der Högbergschen Theorie zu gewinnen

METHODEN

Auch wir verwendeten die von Högberg und Uvnäs benutzte Methode: Durch einen Schlag auf den Kopf wurde die Ratte getötet; unmittelbar darauf wurden Mesenterialstücke entnommen. Diese wurden in 5 ml Tyrodelösung gebracht, in der vorher die entsprechende Menge der Testsubstanz gelöst wurde. Nach 20 Min. im Wasserbad bei 37°C wurden die Proben in einer Lösung von 3,8 % Formaldehyd und 0,1 % Toluidinblau fixiert und gleichzeitig gefärbt, dann zweimal mit Aceton und zweimal mit Xylol gewaschen. Die von Fett und größeren Blutgefäßen befreiten Mesenterialstücke wurden auf einen Objektträger gebracht, mit Caedax eingebettet und mikroskopisch betrachtet. Von jeder Probe wurden an 4 - 5 verschiedenen Stellen jeweils 100 Zellen ausgezählt und in intakte, teilweise und vollkommen zerstörte gruppiert.

Bei den Versuchen in vivo wurden die Testsubstanzen in den entsprechenden Verdünnungen mit physiologischer Kochsalzlösung in die Rattenschwanzvene injiziert. Nach Abwarten der Reaktion wurden die Tiere getötet und die Mesenterial-

stücke wie oben fixiert, gefärbt, eingebettet und mikroskopisch untersucht.

Anschließend wurden die eindruckvollsten Stellen der Präparate mit einer Kleinbildkamera photographiert und davon Vergrößerungen hergestellt.

SUBSTANZEN

Bienengift und seine Bestandteile

Fraktion I oder Melittin ist nach bisherigen Kenntnissen enzymfrei und durch physikochemische Mechanismen wirksam. Es ist allgemeintoxisch, ein Kapillargift und schädigt die Zellmembranen (Habermann¹).

Fraktion II enthält außer Lecithinase noch Hyaluronidase (Habermann und Neumann).

Phospholipase A, aus Bienengift gewonnen, erscheint pharmakologisch (Habermann²) und biochemisch (Habermann und Neumann) einheitlich.

Konzentriertes Gasbrandgift (PI) und seine Bestandteile

PI wird aus Zentrifugaten von Gasbrandkulturen durch Methanolfällung gewonnen und enthält das gesamte biologisch interessierende Material.

α - Toxin scheint reine Lecithinase zu sein. Man kann die toxische und lecithinspaltende Wirkung nicht trennen. Es wirkt auf Gefäße stark permeabilitätserhöhend (Habermann³).

ϕ - Toxin wirkt wie α - Toxin stark hämolsierend. Die biochemische Grundlage seiner Wirkung ist unbekannt.

Beide Toxine wurden ebenso wie Hyaluronidase und Gelatinase von Habermann⁴ aus konzentriertem Gasbrandgift in biologisch, immunologisch und elektrophoretisch einheitlichem Zustand gewonnen.

Schlangengifte

Naja tripudians - Gift: von Fa. Basilisk, Basel bezogen;
Crotalus terrificus - Gift und *Bothrops jararaca* - Gift: beide stammten aus zuverlässiger südamerikanischer Quelle. Sie alle enthalten außer vielen anderen Wirkstoffen auch Lecithinase A.

Lysolecithin wurde von Habermann nach der Methode von Magistris gewonnen und chromatographisch gereinigt. Compound 48/80 ist eine synthetische Substanz mit histaminfreisetzender Wirkung. Sie wurde von der Firma: The Wellcome Research Laboratories, Langley Court, Beckenham, England, zur Verfügung gestellt.

ERGEBNISSE

A.

VERSUCHE ZUR METHODIK

Bei den Vorversuchen fanden wir neben befriedigend dargestellten intacten Mastzellen immer wieder einzelne Zellen, bei denen Granula ausgetreten waren und sogar solche, die nahezu oder völlig zerstört waren. Um die Ursache derartiger Artefakte festzustellen, versuchten wir zunächst, ohne Erfolg, eine andere Fixiermethode, nämlich mit Zenker-Formol. Dann dachten wir daran, daß der Mastzellzerfall mit dem Tode des Versuchstieres zusammenhängen könnte. Aber auch nach Entnahme der Mesenterialstücke vom narkotisierten Tier waren immer wieder geschädigte Zellen zu beobachten. Sie fanden sich meist angehäuft an einzelnen Stellen, sodaß die Annahme mechanischer Läsionen nahe lag. Nun wurden die Mesenterialstücke mit zwei Pinzetten auf Druck und Zug beansprucht, und es zeigte sich, daß die Mastzellen sehr empfindlich gegen Druck, weniger gegen Zug waren (Zerstörungen bis zu 90 %). Selbst bei ganz vorsichtigem Arbeiten konnte die Zerstörung von einzelnen Zellen nicht ganz ausgeschaltet, aber doch auf wenige Prozent herabgedrückt werden. Die Zahl der lädier-

ten Zellen nahm bei der Aufbewahrung der Mesenterialstückchen für 20 Min. bei 37°C in Tyrodelösung, also unter Versuchsbedingungen, etwas zu. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse dieser Versuche zur Methodik.

Tab. 1. Ergebnisse der Versuche zur Methodik.

	intakten Z.	Prozentzahl der tellw. zerst. Z. ganz zerst. Z.	
sofort fixiert	93	5	2
20 Min. in Tyrodelsg. bei 37°C	90	7	3
Narkotisiertes Tier			
sofort fixiert	89	7	4
20 Min. in Tyrodelsg. bei 37°C	91	5	4
Zenker-Formol Fix.			
sofort fixiert	93	5	2
20 Min. in Tyrodelsg. bei 37°C	87	9	4
Beanspruchung auf Zug	76	12	12
Beanspruchung auf Druck	21	9	70

Abb. 1. Normale Mastzellen in 2 600facher Vergrößerung



Zur Berechnung des Streuungsbereiches, wurden die Kontrollwerte aller Versuche, die aus Tab.2. ersichtlich sind, herangezogen. Die Streuung wurde nach der Formel:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n - 1}}$$

für intakte Zellen einerseits und für teilweise und vollkommen zerstörte Zellen andererseits errechnet.

Dabei bedeuten:

d = Differenz der Einzelwerte vom Mittelwert
n = Zahl der Einzelwerte
 σ = Streuung

Aus den angegebenen Werten ergaben sich bei 24 Einzelwerten:

für die intakten Zellen ein Mittelwert $M = 89$, $d^2 = 852$
und die Streuung $\sigma = 6$

für die zerstörten Zellen ein Mittelwert $M = 7$, $d^2 = 1204$
und die Streuung $\sigma = 7$

Tab.2. Kontrollwerte aller Versuche

Intakte Zellen	d^2	zerst. Zellen teilw. ganz	d^2
98	81	1 1	25
96	49	3 1	9
95	36	3 2	4
94	25	3 3	1
93	16	5 2	-
93	16	4 3	-
93	16	6 1	-
93	16	5 2	-
92	9	6 2	1
91	4	6 3	4
91	4	6 3	4
91	4	5 4	4
90	1	7 3	9
89	-	9 2	16
89	-	9 2	16
89	-	8 3	16
89	-	8 3	16
88	1	9 3	25
88	1	9 3	25
85	16	12 3	64
84	25	10 6	81
81	64	14 5	144
77	144	15 8	256
71	324	15 14	484

B.

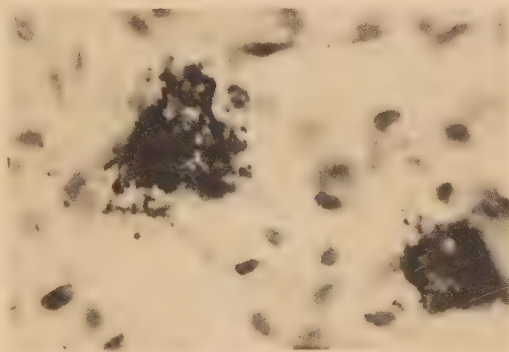
ERGEBNISSE DER VERSUCHE IN VITRO

1.) Bienengift und seine Bestandteile

Nach Zugabe von Bienengift zur Tyrodelösung traten über das ganze Präparat verteilte Zerstörungen auf, wobei die einzelnen Zellen oft wie explodiert erschienen; es blieben kaum noch intakte Mastzellen übrig. Selbst bei einer Verdünnung von 1:1 Mill. war der Zerfall noch sehr deutlich, wogegen das Kontrollpräparat nur wenige zerstörte Zellen aufwies.

Die Versuche mit Fraktion I und Fraktion II zeigten ein durchaus ähnliches Bild, nur waren die Erscheinungen weniger massiv als bei gereinigtem Bienengift (Tab. 3). Auch gereinigte Phospholipase war hochaktiv.

Abb. 2.
Durch Bienengift
zerstörte Mast-
zellen in 2600 -
facher Vergröße-
rung.



Die Mastzellzerstörung durch Bienengesamtgift ist also durch mindestens zwei verschiedene Komponenten bedingt, das enzymfreie Melittin (= Fraktion I) und durch Phospholipase A.

Während der Abfassung unserer Arbeit teilte Riley mit, daß auch er eine starke Mastzellzerstörung durch ein von Habermann übersandtes Melittinpräparat gefunden hat.

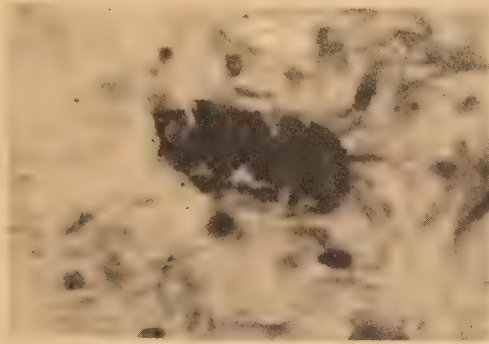
Tab. 3. Mastzellzerstörung durch Bienengift und seine Komponenten in vitro

	Konz.	intakte Zellen %	teilw. zerst. Zellen %	ganz zerst. Zellen %
Bienengift	1/1 000	3	14	83
	1/10 000	4	20	76
	1/100 000	4	25	71
	1/1 Mill	24	26	50
Kontrolle		90	7	3
Fraktion I	1/10 000	20	28	52
	1/100 000	37	16	47
	1/1 Mill	60	16	24
Kontrolle		88	9	3
Fraktion II	1/10 000	34	24	42
	1/100 000	53	22	25
	1/1 Mill	58	20	22
Kontrolle		91	6	3
Phospholipase	1/10 000	4	16	80
	1/100 000	9	31	60
	1/1 Mill	22	22	56
Kontrolle		88	9	3

2.) Gasbrandgift und dessen Bestandteile

Ein massives Zerstörungsbild zeigte sich bei Zugabe konzentrierten Gasbrandgifts (PI_5). Dabei war das ganze Gewebe in Mitleidenschaft gezogen, es schien aufgelockert; die Bindegewebszellen und -fibrillen waren gequollen. Die noch erkennbaren Mastzellen waren auf das Mehrfache des normalen Zellvolumens aufgetrieben, die restlichen erschienen geradezu explodiert. Die ebenfalls vergrößerten Granula waren gut dargestellt und über das ganze Gewebe verstreut. Die ausgeprägte, allgemeine Gewebsschädigung wurde bei größerer Verdünnung des Toxins weniger deutlich. Die Mastzellen selbst waren auch dann noch stark angegriffen.

Abb. 3. Durch Gasbrandgift zerstörte Mastzellen in 2 600facher Vergrößerung.



Außer PI_5 wurden gereinigte Bestandteile des Gasbrandgiftes auf ihre mastzellzerstörende Wirkung untersucht. Dabei zeigten α - Toxin und ϑ - Toxin eine schwächere Wirkung als Gesamtgift. Gelatinase und Hyaluronidase waren, wie zu erwarten war, unwirksam.

Sowohl bei α - Toxin wie auch bei ϑ - Toxin waren die Zellen aufgetrieben und die Granula vergrößert. Bei stärkeren Verdünnungen nahm die Quellung ab, und die Zellgröße wurde wieder normal.

In der folgenden Tabelle wurden die stark gequollenen, aber sonst intakten Zellen zu den teilweise zerstörten gezählt.

Tab. 4. Mastzellzerstörung durch Gasbrandgift und dessen Bestandteile in vitro

	Verd.	intakte Zellen %	teilw. zerst. Zellen %	ganz zerst. Zellen %
PI 5	1/10	15	25	60
	1/50	21	39	40
	1/100	17	26	57
	1/1 000	40	26	34
Kontrolle		93	5	2
α - Toxin	1/10	31	40	29
	1/50	40	33	27
	1/500	51	31	18
	1/5 000	47	32	25
Kontrolle		77	15	8
ϕ - Toxin	1/10	31	35	34
	1/50	57	21	12
	1/500	77	16	7
	1/5 000	76	17	7
Kontrolle		89	9	2
Gelatinase	1/10	95	3	2
Kontrolle		94	3	3
Hyaluronidase	1/10	95	3	3
Kontrolle		95	3	2

Die verwendeten Ausgangslösungen hatten folgende Aktivitäten:

α - Toxin: 250 Lecithinaseeinheiten / ml,
 ϕ - Toxin: 200 000 Hämolyse-einheiten / ml,
 Gasbrandgift: 200 Lecithinase-Einheiten (lf) / ml,
 Gelatinase: 15 Einheiten / ml,
 Hyaluronidase: 1 000 Einheiten / ml.

3.) Versuche mit Schlangengiften

Bei den Versuchen mit Schlangengiften waren manche Zellen etwas vergrößert, meist waren die Zellgrenzen jedoch erhalten. Der Zerstörungseffekt war, die höchsten untersuchten Konzentrationen ausgenommen, sehr gering. Keines der Schlangengifte konnte sich bezüglich Zerstörungskraft mit Bienen- und Gasbrandgift messen (Tab. 5).

Tab. 5. Mastzellzerstörung durch verschiedene Schlangengifte in vitro

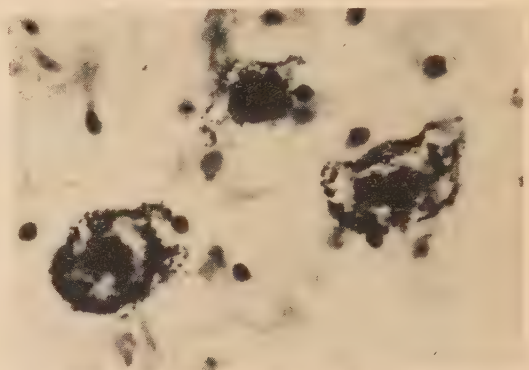
Gift von	Verd.	intakte Zellen %	teilw. zerst. Zellen %	ganz zerst. Zellen %
Naja tripudians	1/1 000	66	10	24
	1/10 000	75	9	16
	1/100 000	85	7	8
	1/1 Mill	90	6	4
Kontrolle		89	8	3
Crotalus terrificus	1/1 000	67	18	15
	1/10 000	64	21	15
	1/100 000	80	13	7
	1/1 Mill	79	14	7
Kontrolle		89	8	3
Bothrops jararaca	1/1 000	65	21	14
	1/10 000	74	18	8
	1/100 000	82	13	5
	1/1 Mill	81	13	6
Kontrolle		84	10	6

4.) Versuch mit Lysolecithin

Bei Behandlung mit Lysolecithin bot sich ein recht typisches Bild. Die Zellen waren aufgetrieben, die Granula aufgelockert. Sie bildeten eine dichtere Randzone um die Zelle, während das Zentrum aufgehellte war. Die Zellen machten dadurch oft noch einen scharfbegrenzten Eindruck. "Explodierte" Zellen waren selten. Bei stärkeren Verdünnungen näherten sich die Zellen allmählich wieder der normalen Größe. So sah man bei einer Verdünnung von 1 : 100 000 zwar

noch randständige Granula, jedoch war die Größe der Zellen wieder normal.

Abb. 4.
Durch Lysolecithin
zerstörte Mastzellen
in 2 600facher Ver-
größerung



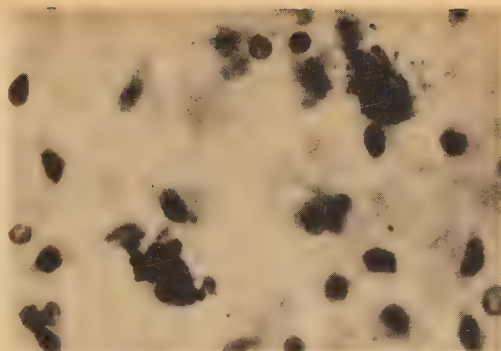
Auch Högberg und Uvnäs stellten mit ähnlicher Methodik die Mastzellzerstörung durch Lysolecithin fest, gaben aber keine Details über die Änderungen des morphologischen Bildes. Diese Substanz wirkte in ihren Versuchen etwas schwächer als Compound 48/80.

5.) Versuch mit Compound 48/80

Compound 48/80 ist ein häufig verwendeter synthetischer Histaminfreisetzer. Seine Fähigkeit zur Mastzellzerstörung ist seit langem bekannt (Riley, Parrat und West, Högberg und Uvnäs). Wir verwendeten ihn, um die Zuverlässigkeit unserer Methodik zu prüfen und eventuelle Besonderheiten im mikroskopischen Bild zu erkennen.

Wie zu erwarten war, wurde in allen untersuchten Verdünnungen ein hoher Prozentsatz der Mastzellen zerstört; dabei fiel eine gewisse Verarmung des gesamten Präparates nicht nur an intakten Zellen, sondern auch an Granula überhaupt auf, sodaß man zu der Annahme gezwungen ist, daß hier auch eine Granulazerstörung stattfindet. Dagegen - oder vielleicht gerade deshalb - waren "Zellexplosionen" kaum zu beobachten.

Abb. 5.
Zwei durch Compound
48/80 angegriffene
Mastzellen in 2 600-
facher Vergrößerung



Tab. 6. Mastzellzerstörung durch Compound 48/80 und Lysolecithin in vitro

	Verd.	intakte Zellen %	teilw. zerst. Zellen %	ganz zerst. Zellen %
Lysolecithin	1/1 000	11	18	71
	1/10 000	12	20	68
	1/100 000	28	42	30
	1/1 Mill	50	30	20
Kontrolle		89	9	2
Compound 48/80	1/1 000	7	12	81
	1/10 000	5	15	80
	1/100 000	12	22	66
	1/1 Mill	29	28	43
Kontrolle		71	15	14

In der obigen Tabelle wurden bei dem Versuch mit Lysolecithin die stark gequollenen Mastzellen zu den teilweise zerstörten gezählt.

C.

ERGEBNISSE DER VERSUCHE IN VIVO

Nachdem in vitro der größte Teil der untersuchten Pharmaca in geeigneten Konzentrationen die Gewebsmastzellen schädigte, interessierte uns, ob diese Potenz auch am lebenden Tier sichtbar gemacht werden könnte. Auch zu diesen Versuchen verwendeten wir Ratten und injizierten die Gifte zur Vermeidung von Resorptionsschwierigkeiten in die Schwanzvene. Das Funktionieren der Methodik wurde durch einleitende Experimente mit Compound 48/80 festgestellt.

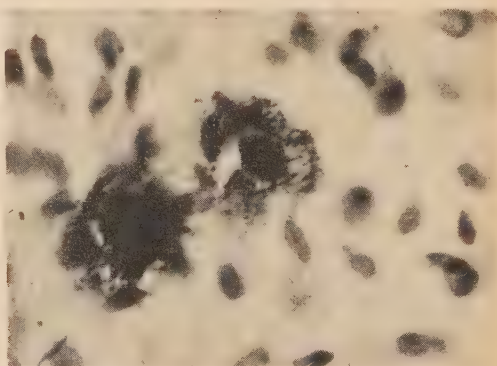
1.) Compound 48/80

Wir injizierten 10 mg/kg Versuchstier und warteten 20 Min. mit der Tötung.

Das Tier wurde zunehmend zyanotisch und schwach, schließlich waren alle Abwehrreaktionen erloschen. Nach Tötung durch Schlag auf den Kopf wurden die Mesenterialstücke sofort entnommen und nach der gleichen Methode wie bei den anderen Versuchen fixiert und gefärbt. Die Mastzellen waren besonders perivaskulär abnorm aufgetrieben und die Granula weit im Gewebe zerstreut. Weiter entfernt von den Gefäßen fanden sich wieder normale Zellen. Der Erfolg war eindeutig (Tab. 7).

Abb. 6.

Durch Injektion von Compound 48/80 geschädigte Mastzellen in 2 600facher Vergrößerung.



2.) Versuche mit Bienengift und Fraktion I

In gleicher Weise wie Compound 48/80 wurde auch Bienengift und Fraktion I appliziert.

Bei Verwendung von 1 mg Bienengift / kg zeigten sich binnen 20 Min. keinerlei Vergiftungserscheinungen; bei 10 mg / kg war das Tier innerhalb weniger Minuten tot. Bei der Sektion schlug das Herz noch. In beiden Fällen war das Verhalten der Mastzellen normal.

Bei Verwendung von 5 mg /kg waren die Vergiftungserscheinungen ein-drucksvoll: zunächst wurde die Atmung ruckartig, dann begann das Tier zu zit-tern und geriet schließlich in Erregungszustände mit starken tonisch - klonischen Krämpfen. Nach 20 Min. wurde das Tier getötet. Die Mastzellen waren fast sämtlich intakt. Die geringe Anzahl der zerstörten Zellen fiel durchaus in den Bereich der Streuung (siehe Seite 10 und Tab. 7).

Bei dem Versuch mit Fraktion I in einer Dosis von 1 mg / kg zeigte das Tier keinerlei Vergiftungserscheinungen. Das Mastzellbild war ebenfalls normal.

3.) Versuche mit Schlangengift

Mit Naja tripudians-Gift wurden 3 Versuche mit einer Dosis von 1 mg /kg durchgeführt. Die Tiere zeigten nach einiger Zeit zunehmende schlechte Atmung, die zuletzt nur noch ruckweise und in größeren Abständen erfolgte und dann ganz aufhörte. Das Mastzellbild war nur in einem Fall verändert, und auch hier tra-ten nur verhältnismäßig wenig zerstörte Zellen auf, so daß der Erfolg zweifel-haft war (Tab. 7).

Crotalus terrificus-Gift wurde ebenfalls in einer Menge von 1 mg /kg ange-wandt. Das Tier reagierte mit leichten Krämpfen, die sich auf die hinteren Extremitäten erstreckten. Dabei sah es aus, als wollte die Ratte auf den "Spit-zen tanzen". Die Intensität der Atmung wechselte. Der Tod trat nach 75 Min. ein. Die Mesenterialstücke zeigten ein normales Mastzellbild.

4.) Versuche mit Gasbrandgift

Verwendet wurden Mengen von 0,1 ml / kg und 1 ml / kg mit rund 4 mg Trockensubstanz / ml. In allen Fällen zeigten sich starke Vergiftungserscheinungen. Eine Lähmung ergriff zuerst die hinteren Extremitäten und schritt dann weiter nach vorne. Der Tod trat nach völliger Apathie binnen 1 Stunde ein. Die Mastzellen erschienen jedoch normal.

Ein weiteres Tier war ausgesprochen arm an Mastzellen und konnte deshalb nicht ausgezählt werden.

Tab. 7. Ergebnisse der Versuche in vivo.

	Menge	intakte Zellen %	teilw. zerst. Zellen %	ganz zerst. Zellen %
Compound 48/80	10mg/kg	34	19	47
Bienengift	1mg/kg	92	6	2
	10mg/kg	90	7	3
	5mg/kg	78	13	9
Fraktion I	1mg/kg	97	13	16
Naja tripudians- Gift	1mg/kg	71	13	16
	1mg/kg	93	3	4
	1mg/kg	89	7	4
Crotalus terri- ficus-Gift	1mg/kg	93	4	3
konzentr. Gasbrandgift (PI ₅)	0,1mg/kg	89	7	4
	1mg/kg	98	1	1

BESPRECHUNG

Unsere in vitro-Versuche zeigen, daß tierische und bakterielle Gifte sicher mehr als einen mastzellzerstörenden Faktor enthalten. Seit Feldberg wird die Mastzellzerstörung durch tierische Gifte immer wieder der darin enthaltenen Phospholipase A zugeschrieben. In der Tat waren Bienengift und auch daraus gewonnene Phospholipase A, sowie eine Zwischenstufe bei der Reinigung, die sogenannte Fraktion II, in unserer Versuchsanordnung recht wirksam. Dies würde ebenso wie die von uns und auch von Högberg und Uvnäs beobachtete Mastzellzerstörung durch Lysolecithin zu der Feldbergschen Theorie passen. Erstaunlich ist allerdings, daß phospholipasehaltige Schlangengifte, wie Klapperschlangengift, Kobragift und Jararacagift, zwar deutlich, aber unverhältnismäßig schwächer als Bienengift und daraus gewonnene Phospholipase A die Mastzellen angriffen, was man vielleicht auf andere Wirkungsbedingungen oder andere physikochemische Konstitution der lecithinasespaltenden Enzyme beziehen könnte. Außerdem fiel auf, daß unter Zusatz von Lysolecithin die Mastzellen eine stärkere Tendenz zur Schwellung zeigten, als bei Anwendung von Phospholipase A. Es ist durchaus möglich, daß bei der Mastzellzerstörung durch Phospholipase A, ähnlich wie etwa bei der Thromboplastinaktivierung durch Bienengift (Habermann⁵) die Phospholipoidzerstörung wichtiger ist, als die Lysolecithinbildung, oder daß an der Zellwand gebildetes Lysolecithin anders wirkt als von außen zugeführtes.

Außer Phospholipase A schädigt auch Phospholipase C die Mastzellen stark. Wir hatten Gelegenheit, ein von Habermann gewonnenes, hochgereinigtes α -Toxin von Clostridium Welchii zu untersuchen, dessen Wirkungen mit den heutigen Methoden nicht von seinem Phospholipase C - Gehalt getrennt werden können. Während der Abfassung dieser Arbeit berichteten auch Riley sowie Uvnäs über Mastzellzerstörung durch Gasbrandgift. Nachdem Phospholipase C vom Lecithinmolekül Phosphorylcholin (nicht wie Riley angibt, Cholin) abspaltet und kein Lysolecithin entstehen läßt, kann hier diese Substanz nicht ohne weiteres als Mittler der Zellzerstörung betrachtet werden.

Neben Phospholipase A und C fanden wir jedoch mindestens zwei weitere mastzellschädigende Komponenten. Die nach den heutigen Kenntnissen enzymfreie Fraktion I von Bienengift (=Melittin) bringt die Mastzellen, ähnlich wie in

der Literatur für alkalische Lösungen beschrieben, geradezu zur Explosion. Vielleicht spielt der basische Charakter dieser Substanz eine Rolle, wenn auch das p_H der Tyrodelösung bei den verwendeten Verdünnungen gewahrt blieb. Auch Riley hatte mit einem von Habermann überlassenen Melittinpräparat ähnliche Ergebnisse. Außerdem wirkte gereinigtes ϑ -Hämolsin von Gasbrandgift, wenn auch schwächer, in gleichem Sinne.

In letzter Zeit haben Högberg und Uvnäs die Feldbergsche Phospholipase - Hypothese insofern weitergeführt, als sie vermuten, daß jede Histaminfreisetzung durch Aktivierung eines zelleigenen lytischen Enzyms, wahrscheinlich Phospholipase A, zustande käme. Später gestand Uvnäs zu, daß es - entsprechend den Anschauungen Rileys - auch eine Phospholipase C sein könnte. Die Beweiskraft der bisher angeführten Versuche ist jedoch weder für die eine noch für die andere Phospholipase überzeugend. Vor allem fehlt bis heute ein Beweis der Existenz derartiger Enzyme in mastzellhaltigen Geweben, geschweige denn in Mastzellen selbst. Sicher kann die Aktivierung eines solchen Enzyms nicht alle zur Mastzellzerstörung führenden Prozesse erklären; bei Anwendung von Alkalien zur Mastzellzerstörung ist z. B. der p_H -Bereich, in dem Phospholipasen wirksam sind, überschritten.

Im Gegensatz zu den zahlreichen positiven Ergebnissen in vitro gelang es in vivo nicht, durch Schlangengifte, Gasbrandgift und Bienengift eine Mastzellzerstörung zu erzielen, wie sie durch Compound 48/80 möglich war. Dieses Ergebnis paßt gut zu den negativen Ergebnissen von Versuchen, eine Steigerung des Histamingehaltes des Blutes von mit Schlangengift behandelten Tieren nachzuweisen (Rocha e Silva und Essex, Chute und Waters, sowie Dragstedt, Mead und Eyer).

Es ist durchaus vorstellbar, daß die von uns untersuchten Pharmaca aus tierischen und bakteriellen Giften durch andere Gewebsteile gebunden werden, ehe sie in Kontakt mit Mastzellen kommen.

ZUSAMMENFASSUNG

Gewebsmastzellen des Rattenmesenteriums können in vitro durch zahlreiche tierische und bakterielle Gifte und deren Inhaltsstoffe geschädigt werden. Von den Komponenten des Giftes des Gasbranderreger s wirken mindestens zwei in dieser Weise, nämlich α - Toxin und β - Toxin, während die beiden Enzyme, Hyaluronidase und Gelatinase, in den untersuchten Konzentrationen inaktiv sind.

Bienengift zerstört Mastzellen nicht nur durch seine Phospholipase A, sondern auch durch seinen Gehalt an Melittin.

Ob in Schlangengiften neben Phospholipase A noch andere mastzellschädigende Faktoren enthalten sind, muß offen bleiben.

In vivo ließ sich keine eindeutige Mastzellzerstörung nach i. v. Injektion der in vitro geprüften Gifte an der weißen Ratte nachweisen, während Versuche mit einem synthetischen mastzellzerstörenden Agens (sogen. Stoff 48/80) positiv verliefen.

Unsere Versuche widerlegen die Anschauung, daß Phospholipasen vom Typ A und C die einzigen mastzellzerstörenden Agentien in tierischen und bakteriellen Giften sind.

Herrn Privatdozenten Dr. E. Habermann möchte ich für die Überlassung des Themas sowie für die unermüdliche Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Arbeit herzlich danken.

Herrn Professor Dr. Dr. Neumann erlaube ich mir für sein freundliches Entgegenkommen und die Übernahme des Korreferates Dank zu sagen.

LITERATURVERZEICHNIS

- ARNOLD, J. : Münch. med. Wschr. 13, 585 (1906)
- BLASCHKO, H. , HAGEN, P. ,
WELCH, A. D. : J. Physiol. 129, 27 (1955)
- BURNETT, R. Y. , HAGEN, P. ,
LEE, F. L. : Biochem. J. 69, 36 P (1958)
- CHUTE, A. L. , WATERS, E. T. : Am. J. Physiol. 132, 552 (1941)
- DRAGSTEDT, C. A. , MEAD, F. B. ,
EYER, S. W. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 37, 709
(1938)
- EHRlich, P. : Arch. mikr. Anat. 13, 263 (1877)
- FELDBERG, W. , HOLDEN, H. F. ,
KELLAWAY, C. H. J. Physiol. 94, 232 (1938)
- FELDBERG, W. , KELLAWAY, C. H. : J. Physiol. 94, 187 (1938)
- HABERMANN, E. (1): Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 222,
173 (1954)
- HABERMANN, E. (2): Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 230,
538 (1957)
- HABERMANN, E. (3): Arch. exper. Path. u. Pharmakol.
im Druck
- HABERMANN, E. (4): Unveröffentlichte Versuche
- HABERMANN, E. (5): Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 223,
182 (1954)
- HABERMANN, E. , NEUMANN, W. P. : Biochem. Zschr. 328, 465 (1957)
- HÖGBERG, B. , UVNÄS, B. : Acta physiol. scand. 41, 345 (1957)
- HOLMGREEN, H. , WILANDER, O. : Zschr. mikr. anat. Forschung 42,
279 (1937)
- HOWELL, W. H. , HOLT, E. : Am. J. Physiol. 47, 328 (1918)

- JORPES, HOLMGREEN, H.,
WILANDER, O.: Zschr. mikr. anat. Forschung 42,
279 (1937)
- KÖKSAL, M.: Nature (Lond.) 172, 733 (1953)
ref. Ber. über d. ges. Physiologie 166,
73 (1954)
- MAGISTRIS, H.: Biochem. Zschr. 210, 85 (1929)
- MAXIMOW, A.: Arch. mikr. Anat. 83, 247 (1913)
- NAGAYO, M.: Zentralbl. allgem. Path. 43, 289 (1913)
- NEUMANN, W., HABERMANN, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 222,
367 (1954)
- RILEY, J.F.: Pharmac. Reviews 7, 267 (1955)
- RILEY, J.F.: J. Pharm. Pharmacol. 10, 271 (1958)
- RILEY, J.F., WEST, G.B.: J. Physiol. 120, 528 (1953)
- ROCHA e SILVA, M.: Arq. Inst. Biol. Sao Paulo 109, 401 (1953)
zit. J. Pharm. Pharmacol. 10, 1 (1958)
- ROCHA e SILVA, M., ESSEX, H.E.: Am. J. Physiol. 135, 372 (1942)
- STAEMMLER, M.: Frankf. Z. Path. 25, 391 (1921)
- UVNÄS, B.: J. Pharm. Pharmacol. 10, 1 (1958)
- UVNÄS, B.: J. Pharm. Pharmacol. 10, 336 (1958)
- WEST, G.B.: Unveröffentlichte Versuche
zit. Pharmac. Reviews 7, 267 (1955)
- WESTPHAL, E.: Dissertation 1880
zit. Zschr. mikr. anat. Forschung 42,
279 (1937)

LEBENS LAUF

Ich wurde am 7. Oktober 1933 als Tochter des Gerbermeisters Rudolf Kachler und seiner Ehefrau Helene in Petschau / Sudetenland geboren.

Dort besuchte ich die Volksschule und trat 1944 in die Oberschule für Mädchen in Karlsbad ein. Nach der Aussiedlung besuchte ich die Mädchenoberrealschule der Englischen Fräulein in Aschaffenburg und legte dort 1953 die Reifeprüfung ab. Seit dem Wintersemester 1953/54 studierte ich in Würzburg Zahnheilkunde und schloß mein Studium im Februar 1958 mit dem Staatsexamen ab.

In der Folgezeit war ich mit der Fertigung meiner Doktorarbeit beschäftigt und trat dann anschließend als Volontärassistentin in die hiesige Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten ein.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Helene Kachler

